

基于二代测序的染色体非整倍体无创产前筛查孕妇血浆中胎儿 DNA 比例的检测和计算方法

李粉霞¹ 欧阳国军² 常清贤¹

(1. 南方医科大学南方医院妇产科, 广东 广州 510515; 2. 广州市达瑞生物技术股份有限公司, 广东 广州 510665)

【摘要】 孕妇血浆中胎儿游离 DNA 的发现已对胎儿染色体非整倍体异常的无创产前检测产生了巨大的变革, 母体血浆中的游离 DNA 越来越被认为是非侵入性检测胎儿发育异常的重要指标。二代测序技术的发展也使染色体非整倍体无创产前筛查(noninvasive prenatal test, NIPT)在临床实践中得到了迅速的开展和推广应用。在 NIPT 筛查中, 血浆中胎儿游离 DNA 比例是整体检测性能的关键参数, 在一定程度上确保对检测结果作出正确的临床解释。本综述中, 我们对目前 NIPT 中胎儿游离 DNA 比例的检测方法和生物信息学算法进行介绍, 并简单讨论各个方法的优缺点。

【关键词】 无创产前筛查, 血浆游离 DNA, 胎儿游离 DNA 比例

【中图分类号】 R715.5 **【文献标识码】** A

人类的 DNA 主要存在于细胞中, 此外还有少量以游离状态存在于循环血中。1948 年 Mandel 和 Métais 发现人体外周循环血中游离 DNA (cell free DNA, cfDNA) 的存在^[1]。1977 年, Leon 等^[2]发现机体血循环中存在肿瘤细胞凋亡后释放出的 cfDNA, 其浓度与肿瘤发展速度相关。1997 年, Lo 等^[3]在孕有男性胎儿的孕妇外周血血浆中检测到 Y 染色体性别决定区 (sex-determine region of the Y chromosome, SRY) 序列, 提出了胎儿游离 DNA (cell free fetal DNA, cffDNA) 的概念, 证实孕妇外周血中存在 cffDNA。cffDNA 主要来源于胎盘合体滋养层细胞^[4], 孕 4~5 周即可在孕妇外周血血浆中检出, 在孕早期占孕妇游离 DNA 总量的 9%, 最高可达 20%^[5]。cffDNA 在胎儿娩出后迅速降解, 分娩后 48h 即检测不到, 因此基于 cffDNA 的检测不受上一胎的影响^[6]。二代测序技术(next-generation sequencing, NGS)的问世, 其高通量、高准确性和低成本的优点加速了针对 cffDNA 测序的研发应用。自 2008 年无创产前筛查技术(non-invasive

prenatal test, NIPT)采用高通量的二代测序技术, 基于孕妇血浆中 cffDNA 对染色体非整倍体的筛查在实验室得到迅速验证^[7,8], 目前 NIPT 在 T21/T18/T13 等染色体非整倍体的筛查已大规模应用于临床, 并已扩展至筛查由拷贝数变异(copy number variants, CNVs)引起的染色体病。但 NIPT 作为一种筛查方法, 仍然存在与胎儿核型不一致的情况。目前的研究认为 NIPT 灵敏度和特异度的影响因素主要是母体血浆中胎儿游离 DNA 所占比例(fetal fraction, FF)过低和胎盘嵌合。FF 值是影响 NIPT 灵敏度的关键因素, 不同的实验方法估算 FF 值的方法不尽相同, 但大多数研究都以 4% 作为 FF 的阈值。当 FF 值高于 4% 时, 绝大多数非整倍体变异应被检出, 但当 FF 值过低时, 非整倍体胎儿的异常染色体的游离 DNA 片段很容易被血浆中母体来源的大量游离 DNA 片段覆盖, 导致假阴性结果^[9]。因此准确评估胎儿游离 DNA 比例非常重要, 可以确保通过质控的样本有足够的胎儿游离 DNA 而获得可靠的测序结果。本文将对基于二代测序的染色体非整倍体无创产前筛查中孕妇血浆中胎儿 DNA 比例的检测方法进行综述。

1 基于 Y 染色体的方法

基于 Y 染色体测定母体血浆胎儿游离 DNA 比例的研究,是以检测 Y 染色体上的基因如 SRY、DYS14 和 ZFY 基因来代表母体外周血血浆中胎儿游离 DNA 含量,并以管家基因代表母体血浆中总的游离 DNA 来进行定量,多采用荧光定量扩增(RT-qPCR)的方法。正常女性不含有 Y 染色体,如果在孕妇血液中检测出了来源于 Y 染色体的 DNA 片段,那么它就一定是来自于胎儿,但该方法不适用于女性胎儿^[10-12]。无创产前筛查中,基于该原理对胎儿游离 DNA 比例的估算是将对比到 Y 染色体上的序列 reads,转化计算胎儿游离 DNA 比例^[13,14]。考虑到母体来源的 DNA 可能被错误比对到 Y 染色体上,Hudecova 等^[14]利用检测成人男性血浆中的 Y 染色体序列(male %chrY)和怀孕正常女性胎儿孕妇血浆中的 Y 染色体序列(female %chrY)来计算胎儿游离 DNA 比例(F)。由于 %chr Y = (male%chrY × F) + female %chr Y × (1-F),所以 $F = (\% \text{chrY} - \text{female} \% \text{chr Y}) / (\text{male} \% \text{chrY} - \text{female} \% \text{chr Y})$ 。另一种算法是唯一比对到 Y 染色体上的 reads 部分。Bayindir 等^[15]将基因组划分为 50kb 的 bins,每个 bin 的 reads 被确定,胎儿 DNA 浓度 $F = (\text{med}(\text{Chr}_{\text{auto}}) - \text{med}(\text{ChrX})) / \text{med}(\text{Chr}_{\text{auto}}) \times 2$,另一个算法是 $F = \text{med}(\text{chrY}^{\text{mask}}) / \text{med}(\text{chr}_{\text{auto}}) \times 2$ 。van Beek 等^[16]研发的算法称为 DEFRAG,标准化男性女性的胎儿 DNA 比例去除单独 Y 染色体的序列, $F = (\% Y_{\text{XY fetus}} - \% Y_{\text{XX fetus}}) / \% Y_{\text{XY man}}$ 。NIPT 基于 Y 染色体的含量来计算胎儿 DNA 比例,优点是简单、准确,没有额外的实验操作。缺点是只能针对男性胎儿,不能用于女性胎儿。

2 基于 SNP 位点的方法和算法

2.1 基于 SNP 位点双亲基因型的方法 基于 Y 染色体的方法不能检测女胎的比例,研究者发明了基于检测双亲 SNP 位点的基因型或多态性的插入/缺失作为标志物,计算胎儿游离 DNA 比例的方法^[17,18]。因为胎儿的遗传物质一半来自父亲,另一半来自母亲,可以通过在母体血浆中检测父源遗传

物质的含量来推算出胎儿游离 DNA 比例。这种方法目前主要基于单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点来实现,找出父亲和母亲都是纯合的但基因型不同的 SNP 位点,例如父亲基因型为 A/A,母亲基因型为 C/C,胎儿的基因型为杂合的 A/C 位点,通过计算胎儿特异性等位基因 A 的占比来计算胎儿游离 DNA 比例。为提高准确性往往会计算较多的 SNP 位点,Lo 等^[17]招募了一对怀孕的夫妇,对双方的外周血白细胞 DNA 进行分型,鉴定出 45,392 个父亲和母亲都是纯合的但基因型不同的 SNP 位点。基于该思路,也有学者选择多态性的插入/缺失作为标志物来计算母体血浆中的胎儿游离 DNA 比例,Barrett 等^[18]通过设计了一个含 35 个多态性插入/缺失的多重 PCR 引物方案,通过多重 PCR 扩增,计算胎儿 DNA 比例 $F = ((2 \times \text{fetal allele}) / (\text{shared allele} + \text{fetal allele})) \times 100\%$ 。基于位点多态性进行胎儿游离 DNA 比例的估算方法,优点是非常准确,但需要额外的实验,有时候会被样本限制。因为临床上常规 NIPT 只收集母亲的血液样本,父亲外周血的获取比较困难,且由于可能存在的非父源性,所以这种方法用于常规 NIPT 有一定的局限性。

2.2 利用 SNP 位点的基于高深度靶向测序的方法和算法 为避免对父亲基因型信息的要求,研究者通过靶向二代测序分析高深度的母体血浆游离 DNA 序列鉴定母亲是纯合(AA)而胎儿是杂合(AT)的 SNP 位点来计算胎儿游离 DNA 比例^[19-21]。Chu 等^[19]基于靶向测序的数据,依据血浆中胎儿父系遗传的多态双等位基因标记,提出了一种创新的高度准确的对母体血浆中胎儿游离 DNA 比例的测定算法。Sparks 等^[20]对基于该方法估算胎儿 DNA 比例的无创产前检测 T21 和 T18 进行了评估,结果显示可以准确检测胎儿非整倍体。Liao 等^[21]采用靶向捕获二代测序的方法,利用人类全基因组 SNP 分型 6.0 试剂盒对母体外周血血浆 DNA 进行分型,鉴定了 105 209-127 638 个母亲是纯合(AA)而胎儿是杂合(AT)的有信息的 SNP 位点,进而计算胎儿游离 DNA 比例。Jiang 等^[22]基于高深度的二代测序数据开发的算法命名为 Fe-

talQuant,该方法利用母胎基因型组合的规律来分析胎儿游离DNA比例,母亲基因型纯合AA表示,杂合AB表示,胎儿基因型用下标表示,母胎基因型的组合有四种类型 AA_{AA} 、 AA_{AB} 、 AB_{AA} 、 AB_{AB} 。A是最广泛分布的等位基因,B是次广泛分布的等位基因,所以AA代表纯合,AB代表杂合。根据测序数据,计算每个SNP位点(i)的等位基因组成 $A(a_i)$ 和 $B(b_i)$ 。母体血浆中B等位基因的浓度在0和0.5之间变动,取决于该样本胎儿游离DNA的比例, AA_{AA} 是0, AB_{AB} 是0.5, AA_{AB} 是 $f/2$, AB_{AA} 是 $0.5-f/2$,其中f为胎儿DNA比例,为胎儿基因型频率。由于测序误差和随机变异,实际与预期的B等位基因浓度可能会有偏差,通过建立一个二项分布的混合模型,对各组合所占的比例进行估算,从而准确估算出胎儿游离DNA比例。这个模型中胎儿游离DNA比例通过极大似然法计算,该方法的预测结果与基于亲本基因型的方法推断的结果非常接近。但局限性在于需靶向测序,测序深度需高于120x才能确保检测到胎儿特定的等位基因。

2.3 利用SNP位点的基于低深度测序的改进算法 FetalQuant^{SD} Jiang等^[23]随后又开发了基于低深度测序对胎儿游离DNA比例进行估算的算法,称为FetalQuant^{SD},SD代表低深度(shallow-depth)。该方法基于常规NIPT检测0.03X的全基因组测序数据,因此很容易应用于实验室的NIPT检测服务数据,由此获得准确的胎儿游离DNA片段比例信息可用于质控,且可被嵌入诊断算法中以增加诊断性能。该方法首先用基于微阵列的基因分型法对母血白细胞进行分型鉴定出孕妇的纯合SNP位点,然后鉴定出测序数据中的非母体等位基因(non-maternal alleles),这些理论上是胎儿遗传自父亲的等位基因,当然也有一小部分非母体等位基因可能是由于测序误差和母血分型错误造成的误差。假设这些误差在不同样本中是一致的,所以母体血浆中的非母体等位基因与胎儿游离DNA比例应该是成线性的。随后基于非母体等位基因比例和确切的基于双亲基因分型方法计算的胎儿游离DNA比例,建立一个线性回归模型的校准曲线。基于这个独立样本验证数据库建立的受训过的模型,即使只有1

百万的测序reads,胎儿游离DNA比例也能被准确的预测。但这个模型的参数是变化的,基于不同的测序和基因分析平台,因为不同的平台有不同的误差性,可能影响非母体等位基因的计算。另一方面,不同种类人群的SNPs具有异质性,这也会影响胎儿游离DNA比例的估算。该方法需额外对母体外周血的白细胞进行基因分型,该方法在有8百万reads的情况下,需检测30万个SNPs位点基因分型,采用illumina的HumanCore-24 DNA基因分型试剂盒进行多重分析。该方法的缺点在于,需要获得母体的基因型来估算胎儿游离DNA比例,且基因分型试剂成本相对较高;且该模型的线性校准曲线在不同的测序方法平台和基因分型平台及不同的人群也需要重建。该模型的优点是如果建立了基于相同平台和同一人群,一个被训练过的良好模型,它可以直接应用于各个数据库。

3 基于DNA片段大小的方法

Lo等^[17]的研究发现孕妇血浆中胎儿来源和母亲来源的游离DNA片段大小的组成不同,呈现不同的断裂模式,胎儿来源的游离DNA片段比母体来源的短,相对于总DNA片段峰值所在的166bp,胎儿游离DNA组分在166bp处减少,而在150bp以下增加。因此,较高的胎儿游离DNA比例理论上应该与短游离DNA分子的增加有关。Yu等^[24]在2014年基于双端测序的数据发现,相对于胎儿游离DNA浓度低的样本,胎儿游离DNA浓度高的样本150bp以下片段的组分更多,而166bp的游离DNA组分降低,可以通过计算孕妇血样中长度在100~150bp的游离DNA片段部分与长度在163~169bp的游离DNA片段部分的相对比例来估算胎儿游离DNA比例,即 $Size\ ratio = P(100-150)/P(163-169)$ 。通过对73个样本的研究,36个样本用于建模,37个样本来验证,用基于Y染色体检测的游离DNA比例对照,发现这个片段比值(size ratio)与胎儿游离DNA比例线性相关($r=0.827$, $P<0.001$)。即利用该方法推断的游离DNA比例与基于Y染色体序列的比例高度一致。该方法的缺点在于双端测序价格高且时间长,当建库过程加

入胎儿 cfDNA 富集方法时会导致片段分布发生偏移,限制了它作为常规步骤植入临床的实施,改进的办法是对母体外周血中的 cfDNA 片段长度的数据,采用拥有 K 个正态分布的高斯混合模型,对母体和胎儿的 cfDNA 进行量化,自动准确的获取五个波峰和对应的分布范围,重新拟合参数得到胎儿 cfDNA 的浓度(专利号:ZL 2017 1 0140534.8)。

4 基于低深度单端测序数据建立的 SeqFF 模型

基于游离 DNA 片段长度, Kim 等^[25]开发了一个基于单端低深度测序数据评估胎儿游离 DNA 比例的方法 SeqFF,利用常规的 NIPT 数据直接评估胎儿游离 DNA 比例,不需要增加额外的工作。该方法的原理如下:孕妇血浆中的胎儿游离 DNA 在染色体各区段上的分布是不均匀的,有的区段多,有的区段少,影响因素比较复杂,主要有基因密度和 CG 含量。该方法的流程如下:首先将各常染色体按照每 50kb 分割成区间窗口,称为 bin,计算出每个 bin 的短片段比率,即小于 150bp 的游离 DNA (ccfDNA)数量除以小于 600bp 的 ccfDNA 数量;随后加入各区段基因密度和 CG 含量的参数进行分析,构建一个多元回归模型,即 SeqFF 模型。纳入分析的染色体不包括 13 号、18 号、21 号和性染色体 X、Y。这个模型的参数由弹性网(Enet)和降秩回归模型(WRSC)来决定。通过对两个独立样本群的研究,发现 SeqFF 方法与基于 Y 染色体的方法显示了很高的相关性, r 值分别为 0.932 和 0.938 (Pearson 相关性)。与基于 SNP 位点的方法的相关性为 0.921。双端测序的数据表明小于 150bp 的更短的 ccfDNA 不均匀地分布在全基因组中。片段分析显示增加的短的 ccfDNA 更可能来自胎儿,这部分在 SeqFF 算法中提供了更多的信息。但这个高维回归模型需要大样本量的训练,当胎儿游离 DNA 比例低于 5% 时,模型的效能极大恶化,可能是由于训练库中胎儿游离 DNA 低于 5% 的样本不足以训练弹性网模型^[25]。

5 基于 DNA 甲基化水平的方法

DNA 甲基化是在胞嘧啶核苷酸上加入甲基的

过程^[26]。在哺乳动物体细胞中, CpG 二核苷酸中胞嘧啶 DNA 甲基化很常见,约占 70% 的 CpGs 区域^[27]。不同的器官组织具有不同的甲基化模式,通过分析这些区域不同的甲基化状态可以区分其来源^[28,29]。基于此,研究人员使用了胎盘特异性甲基化标记物来估计胎儿游离 DNA 比例^[30,31]。Chan 等^[30]的研究发现 RASSF1A 肿瘤抑制基因的启动子在胎盘中是高甲基化的,但是母体血细胞是低甲基化的。基于此,采用 RT-PCR 检测用甲基化敏感的限制性内切酶消化过的 RASSF1A 基因,母体来源的低甲基化的 RASSF1A 被内切酶消化掉,而胎儿来源的超甲基化可以抵抗内切酶,因此可用 RT-PCR 检测到。结果显示孕妇血浆中可以检测到超甲基化的 RASSF1A 基因,内切酶消化后的血浆 RASSF1A 基因通过基因分型鉴定为胎儿来源。Nygren 等^[31]采用两组独立的标志物, Y 染色体性染色体决定区的 SOX14 基因和 TBX3 基因,基于核酸质谱 MALDITOF MS 单基因延伸技术对内切酶消化过的血浆 DNA 进行检测,开发了一种估算胎儿游离 DNA 比例的检测方法,命名为 FQA (fetal quantitative assay),通过比较胎盘和孕妇血浆单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)中 5 个不同甲基化区域 CDC42EP1, MGC15523, SOX14, SPN 和 TBX3,发现胎盘中增加的甲基化水平和母体血浆单核细胞的无甲基化。在 FQA 中,通过测量甲基化敏感限制性内切酶酶切后的总游离 DNA (母体和胎儿)和胎儿甲基化游离 DNA 的拷贝数来估算胎儿游离 DNA 占比,其检测结果与基于 Y 染色体的定量方法具有较好的一致性 ($r=0.85$, $P<0.001$)。但是量化这些表观遗传标记的分析过程涉及到对甲基化敏感的限制性内切酶,其稳定性尚需大样本、多中心研究的验证。Lun 等^[32]采用全基因组亚硫酸氢盐测序,根据不同甲基化区域胎儿来源 DNA 的比例不同来估算胎儿 DNA 比例,通过两种方法分析孕妇血浆 DNA 甲基化谱,将加了 adapter 的 DNA 分两份,一份经亚硫酸盐处理的,一份未处理的,通过 10 个 PCR 循环来富集。第一个方法应用孕妇血样本和母胎多态位点基因型不同分析胎儿特定的 DNA。第二个方法应

用母血的甲基化谱和孕妇血浆中的胎儿 DNA 部分甲基化谱,根据母体血浆 DNA 测序数据推断胎盘甲基化谱。对孕早期、孕后期和妊娠结束后胎儿、胎盘和母体血浆的甲基化谱进行系列评估,观察不同孕期甲基化谱的改变,发现不论在全基因组水平和单个 CpG 区域上,孕妇血浆推断的胎儿甲基化谱与胎盘甲基化谱类似,基因分型方法也验证了这一结果。因此基于 cfDNA 的不同组织来源的甲基化模式不同,Sun 等^[29]开发了一个称为血浆 DNA 组织甲基化谱的方法,利用全基因组亚硫酸氢盐测序,采用 5820 个 DNA 甲基化标记物推断孕妇血浆中 cfDNA 的不同组织来源占比。然而,目前基于亚硫酸氢盐全基因组测序的组织定位算法来推断胎儿游离 DNA 比例对于常规 NIPT 来说太昂贵。

6 基于核小体足迹的方法

近年来,血浆游离 DNA 的核小体来源被认为是研究发展方向之一^[17,24,33,34]。早期的两个主要研究已揭示母体血浆游离 DNA 的片段大小及不同胎儿浓度的母体血浆中游离 DNA 片段的分布^[17,24],总的母体血浆游离 DNA 在 166bp 有个主峰,然后是以 10bp 周期性递减的一系列小峰,说明血浆游离 DNA 分子大小主要是 166bp,而胎儿游离 DNA 片段主要在 143bp,暗示 166bp 代表核小体长度外加一个连接子(linker),而 143bp 是被剪掉连接子的核小体长度^[17]。Starver 等^[33]猜测母体游离 DNA 和胎儿游离 DNA 片段大小不同是由于凋亡细胞的 DNA 核小体包裹不同或结合度不同而造成的,胎儿游离 DNA 比例应该和核小体剪切位置关联,研究

收集了 398 例产妇的血浆样本,基于游离 DNA 的单端测序数据生成了全基因组核小体图谱,发现胎儿游离 DNA 和母体游离 DNA 的 DNA 消化存在差异,可由此来计算母体血浆中男胎和女胎的游离 DNA 比例。该方法被称为 SANEFALCON,不需要昂贵的双端测序和额外的检测实验,能被嵌入经济有效的 NIPT 作为一个工具评估胎儿游离 DNA 比例。有趣的是,该研究发现在推断的核小体中心上下游 73bp 出现的频繁 reads 与胎儿游离 DNA 比例关联,但相对于其它方法,关联度较低($r = 0.636$),因此基于核小体足迹的计算胎儿游离 DNA 比例的方法在应用于临床时需要更多实验来验证。

讨论

综上,各种估算母体血浆中胎儿游离 DNA 比例的方法有各自的优点和局限性,该综述对各方法进行了归纳汇总(表 1),并对原理作一简单示例图(图 1)。目前对各方法在实际应用中的研究的评估报道主要有, van Beek 等^[16]通过对基于 Y 染色体的 DEFrag 法,基于游离 DNA 片段大小的 SeqFF 法和基于核小体的 SANEFALCON 法的比较,建议采用 SANEFALCON 法检测血浆中有无胎儿游离 DNA 的存在,SeqFF 法评估怀孕女胎的胎儿游离 DNA 比例,采用基于 Y 染色体的方法 DEFrag 等评估怀孕男胎的胎儿游离 DNA 比例。Hestand 等^[35]也基于 14379 个样本对 NIPT 胎儿游离 DNA 比例的评估方法做了比较,包括 DEFrag, SANEFALCON 和 SeqFF,发现对于男性胎儿基于 Y 染色体的 DEFrag 最佳,对于女性胎儿 SeqFF 方法最好。

表 1 无创产前筛查中孕妇血浆 cfDNA 比例的检测及计算方法汇总

方法	优点	局限性	主要参考文献
基于 Y 染色体的方法	简单,准确	只能检测男性胎儿,不适合女性胎儿	13, 14
基于双亲 SNP 位点基因型的方法	直接,准确	父源 DNA 可能获取不到	17
利用 SNP 位点基于高深度靶向测序的方法(FetalQuant)	只做母体血浆 DNA 测序;准确	高深度测序,120x 以上	19—22
利用 SNP 位点低深度测序的改进算法(FetalQuant ^{SD})	低深度的母体血浆 DNA 测序;准确	母体基因型的检测需要增加额外的费用;校准曲线在不同测序和分型平台需要重建	23
基于 DNA 片段大小的方法	只需要低深度的母体血浆 DNA 测序;容易整合进常规 NIPT 检测	准确性中等;双端测序的成本增加	24
基于低深度单端测序数据建立的 SeqFF 模型	低深度的母体血浆 DNA 测序;单端测序;容易整合进常规 NIPT 检测	需要大样本来训练中立的网络模型;当胎儿 DNA 比例低于 5%是需要增加准确性	25
基于 DNA 甲基化水平的方法	准确	甲基化测序的亚硫酸氢盐转化和甲基化敏感限制性内切酶消化都会影响准确性;相对于常规 NIPT,全基因组亚硫酸氢盐测序的费用非常昂贵	29—32
基于核小体足迹的方法	只需要低深度的母体血浆 DNA 测序	准确性低;在模型构建时需要高深度测序的数据进行训练	33

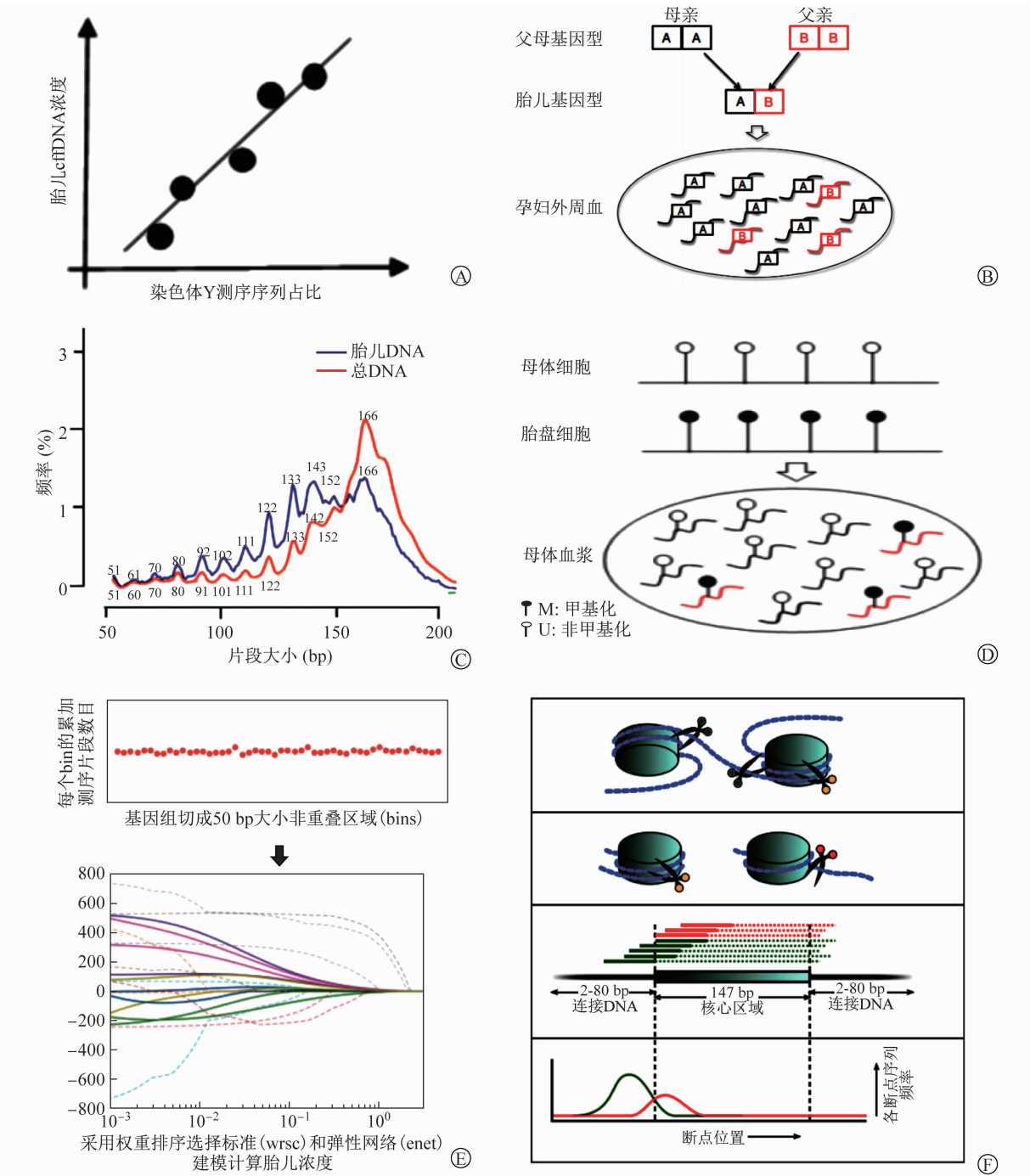


图 1 无创产前筛查中孕妇血浆 cfDNA 比例的检测方法原理图

A: 基于 Y 染色体的方法示意图; B: 基于 SNP 位点双亲基因型的方法; C: 基于片段大小的方法;
D: 基于甲基化的方法; E: 基于低深度单端测序数据的 SeqFF 模型; F: 基于核小体足迹的方法。

结论

随着近十年二代测序技术和对血浆 cfDNA 生物信息学算法的迅猛发展,基于二代测序方法无创筛查胎儿染色体非整倍体已被广泛应用,并成为转化医学的典范。对于 NIPT,一个快速、简单、准确

而经济有效的评估胎儿游离 DNA 比例的方法成为亟待要解决的问题,特别是越来越多的研究探讨将 NIPT 应用到无创单基因病的临床实践中。准确估算低比例的胎儿游离 DNA 比例成为决定 QC 质控的关键点,对临床结果的解读也至关重要。另一方面,胎儿游离 DNA 比例与妊娠结局有关,例如较低

的胎儿游离DNA比例可能与小胎盘或功能障碍的胎盘相关,暗示其还具有潜在的辅助诊断价值^[36]。目前仍需要对各种估算方法的大规模、大样本、多中心的对比验证研究。还有研究发现,母体血浆中胎儿来源的cfDNA片段末端的偏好性和母体来源的cfDNA片段末端偏好性不同,不同类型片段末端比例可能与母体血浆中的胎儿DNA比例相关^[37]。另,不同生理和病理状态下母体血浆胎儿游离DNA比例,各因素互作的分子机制也需要去阐明,例如甲基化、核小体足迹、母体血浆DNA末端切割模型的潜在机制。

参考文献

- [1] MANDEL P, METAIS P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme [Nuclear Acids In Human Blood Plasma][J]. C R Seances Soc Biol Fil, 1948, 142(3-4):241-243.
- [2] LEON SA, SHAPIRO B, SKLAROFF DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy [J]. Cancer Res, 1977, 37(3):646-650.
- [3] LO YM, CORBETTA N, CHAMBERLAIN PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum[J]. Lancet, 1997, 350(9076):485-487.
- [4] BIANCHI DW. Circulating fetal DNA: its origin and diagnostic potential-a review[J]. Placenta, 2004, Suppl A:S93-S101.
- [5] LUN FM, CHIU RW, CHAN KC, et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2008, 54(10):1664-1672.
- [6] YU SC, LEE SW, JIANG P, et al. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing[J]. Clin Chem, 2013, 59(8):1228-1237.
- [7] CHIU RW, CHAN KC, GAO Y, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(51):20458-20463.
- [8] FAN HC, BLUMENFELD YJ, CHITKARA U, et al. Non-invasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(42):16266-16271.
- [9] FIORENTINO F, BONO S, PIZZUTI F, et al. The importance of determining the limit of detection of non-invasive prenatal testing methods[J]. Prenat Diagn, 2016, 36(4):304-311.
- [10] LO YM, TEIN MS, LAU TK, et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for noninvasive prenatal diagnosis[J]. Am J Hum Genet, 1998, 62(4):768-775.
- [11] ZIMMERMANN B, EL-SHEIKHAH A, NICOLAIDES K, et al. Optimized real-time quantitative PCR measurement of male fetal DNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2005, 51(9):1598-1604.
- [12] LUN FM, CHIU RW, CHAN KC, et al. Microfluidics digital PCR reveals a higher than expected fraction of fetal DNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2008, 54(10):1664-1672.
- [13] CHIU RW, AKOLEKAR R, ZHENG YW, et al. Non-invasive prenatal assessment of trisomy 21 by multiplexed maternal plasma DNA sequencing: large scale validity study[J]. BMJ, 2011, 342:c7401.
- [14] HUDECOVA I, SAHOTA D, HEUNG MM, et al. Maternal plasma fetal DNA fractions in pregnancies with low and high risks for fetal chromosomal aneuploidies[J]. PLoS One, 2014, 9(2):e88484.
- [15] BAYINDIR B, DEHASPE L, BRISON N, et al. Noninvasive prenatal testing using a novel analysis pipeline to screen for all autosomal fetal aneuploidies improves pregnancy management[J]. Eur J Hum Genet, 2015, 23(10):1286-1293.
- [16] VAN BEEK DM, STRAVER R, WEISS MM, et al. Comparing methods for fetal fraction determination and quality control of NIPT samples[J]. Prenat Diagn, 2017, 37(8):769-773.
- [17] LO YM, CHAN KC, SUN H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus[J]. Sci Transl Med, 2010, 2(61):61-91.
- [18] BARRETT AN, XIONG L, TAN TZ, et al. Measurement of fetal fraction in cell-free DNA from maternal plasma using a panel of insertion/deletion polymorphisms[J]. PLoS One, 2017, 12(10):e0186771.
- [19] CHU T, BUNCE K, HOGGE WA, et al. A novel approach toward the challenge of accurately quantifying fetal DNA in maternal plasma[J]. Prenat Diagn, 2010, 30(12-13):1226-1229.
- [20] SPARKS AB, STRUBLE CA, WANG ET, et al. Noninvasive prenatal detection and selective analysis of cell-free DNA obtained from maternal blood: evaluation for trisomy 21 and trisomy 18[J]. Am J Obstet Gynecol, 2012, 206(4):319.e1-e9.
- [21] LIAO GJ, LUN FM, ZHENG YW, et al. Targeted massively parallel sequencing of maternal plasma DNA permits efficient and unbiased detection of fetal alleles[J]. Clin Chem, 2011, 57(1):92-101.
- [22] JIANG P, CHAN KC, LIAO GJ, et al. Fetal Quant: deducing fractional fetal DNA concentration from massively parallel sequencing of DNA in maternal plasma[J]. Bioinformatics, 2012, 28(22):2883-1890.
- [23] JIANG P, PENG X, SU X, et al. FetalQuant^{SD}: accurate quantification of fetal DNA fraction by shallow-depth sequencing of maternal plasma DNA[J]. NPJ Genom Med, 2016, 1:16013.
- [24] YU SC, CHAN KC, ZHENG YW, et al. Size-based molecular diagnostics using plasma DNA for noninvasive prenatal testing[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(23):8583-8588.
- [25] KIM SK, HANNUM G, GEIS J, et al. Determination of fetal DNA fraction from the plasma of pregnant women using sequence read counts[J]. Prenat Diagn, 2015, 35(8):810-815.
- [26] BESTOR TH. The DNA methyltransferases of mammals [J]. Hum Mol Genet, 2000, 9(16):2395-2402.
- [27] BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory

- [J]. Genes Dev, 2002, 16(1):6-21.
- [28] POON LL, LEUNG TN, LAU TK, et al. Differential DNA methylation between fetus and mother as a strategy for detecting fetal DNA in maternal plasma[J]. Clin Chem, 2002, 48(1):35-41.
- [29] SUN K, JIANG P, CHAN KC, et al. Plasma DNA tissue mapping by genome-wide methylation sequencing for noninvasive prenatal, cancer, and transplantation assessments[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(40):E5503-E5512.
- [30] CHAN KC, DING C, GEROVASSILI A, et al. Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis[J]. Clin Chem, 2006, 52(12):2211-2218.
- [31] NYGREN AO, DEAN J, JENSEN TJ, et al. Quantification of fetal DNA by use of methylation-based DNA discrimination[J]. Clin Chem, 2010, 56(10):1627-1635.
- [32] LUN FM, CHIU RW, SUN K, et al. Noninvasive prenatal methylomic analysis by genomewide bisulfite sequencing of maternal plasma DNA[J]. Clin Chem, 2013, 59(11):1583-1594.
- [33] STRAVER R, OUDEJANS CB, SISTERMANS EA, et al. Calculating the fetal fraction for noninvasive prenatal testing based on genome-wide nucleosome profiles[J]. Prenat Diagn, 2016, 36(7):614-621.
- [34] SNYDER MW, KIRCHER M, HILL AJ, et al. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin[J]. Cell, 2016, 164(1-2):57-68.
- [35] HESTAND MS, BESSEM M, VAN RIJN P, et al. Fetal fraction evaluation in non-invasive prenatal screening (NIPS)[J]. Eur J Hum Genet, 2019, 27(2):198-202.
- [36] SHEPARD TH, FITZSIMMONS JM, FANTEL AG, et al. Placental weights of normal and aneuploid early human fetuses[J]. Pediatr Pathol, 1989, 9(4):425-31. Erratum in: Pediatr Pathol, 1990, 10(1-2):305.
- [37] CHAN KC, JIANG P, SUN K, et al. Second generation noninvasive fetal genome analysis reveals de novo mutations, single-base parental inheritance, and preferred DNA ends[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(50):E8159-E8168.

(收稿日期:2023-08-09)

编辑:刘邓浩

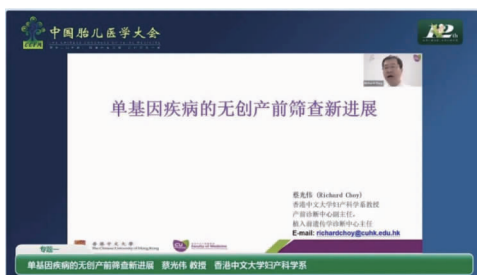
· 视频导读 ·

单基因疾病的无创产前筛查新进展

蔡光伟

(香港中文大学 妇产科学系, 中国 香港)

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2023.04.013



目前,无创产前非整倍体筛查已经有了明确的指南和质控标准体系,全国各地都在有序开展,使得孕妇不用再必须进行侵入性产前诊断,可以在孕早期获知胎儿情况,但是,由于目前普及的无创筛查技术侧重于13、18、21-三体等非整倍体变异,而对于总体发病率在1/100的单基因罕见病却无能为力。

来自香港中文大学的蔡光伟教授给我们带来了单基因疾病的无创产前筛查新进展,蔡教授主要从单基因病无创筛查的概念,临床研究的最新进展及应用三个方面进行了探讨。首先作者详细介绍了目前单基因病无创产前检测主要依赖的两个手段:相对突变剂量和相对单倍型剂量。其次,介绍了来自贝勒医学院的包含30个基因,44种AD遗传病检测panel,检测的疾病累计发病率约1/600,总体阳性检出率为5.7%。以及来自英国的NHS将NIPD应用于软骨发育不全和致死性骨发育不良的研究概况。最后,蔡教授介绍了一个覆盖64个AD基因,92种疾病(综合发病率约1/180)的NIPS 2.0 panel,尤其适合B超提示NT增厚和先天性心脏病缺陷胎儿,且夫妻双方不愿意进行有创产前诊断的家系可以尽早明确胎儿异常病因,从而提前产前诊断时间。无创单基因遗传病的产前筛查应用可以提前产前诊断时间,尽早明确超声异常胎儿病因,实现了对孕期无症状遗传病的产前诊断。